

**CULTIVO *IN VITRO* DE *Sequoia sempervirens* L. EM MEIO DE NUTRITIVO
ESTERILIZADO COM HIPOCLORITO DE SÓDIO**

***IN VITRO* CULTURE OF *Sequoia sempervirens* L. ON NUTRITIVE MEDIA
STERILIZED WITH SODIUM HYPOCHLORITE**

Juliana Martins Ribeiro¹ Silvio Lopes Teixeira² Débora Costa Bastos³

RESUMO

A autoclavagem, técnica utilizada para esterilização de vidraria, meios de cultura e materiais cirúrgicos em laboratório, é uma operação onerosa, em razão do elevado custo do equipamento e do igualmente elevado consumo de energia. Por tais motivos, a substituição dessa técnica de esterilização por outra com custo reduzido, tal como a esterilização química, seria altamente desejável. A presente pesquisa teve como objetivo a comparação entre as técnicas de esterilização de meios de cultura de tecidos vegetais com hipoclorito de sódio e por autoclavagem, em culturas de *Sequoia sempervirens*, de modo a obter um procedimento menos dispendioso. O teste foi realizado com *Sequoia sempervirens* em meios de cultura adicionados das seguintes porcentagens (p/v) de hipoclorito de sódio: A) 0%, autoclavado (tratamento-controle A); B) 0,002%; C) 0,003%; D) 0,004%; E) 0,005%; e F) 0%, sem autoclavar (tratamento-controle B). Observou-se que as concentrações de hipoclorito de sódio a partir de 0,003% adicionadas ao meio nutritivo resultaram em uma completa esterilização do meio, bem como em plantas com maiores números e comprimento de ramos.

Palavras chave: autoclavagem; esterilização química; contaminação.

ABSTRACT

The autoclaving used for sterilization of glassware, culture media and surgical materials in laboratory is a costly operation, due to the high cost of the equipment and the equally high consumption of energy. For these reasons, the substitution of this sterilization technique for another less costly one, such as chemical sterilization, would be highly desirable. The present study aimed to compare the techniques of sterilization of plant tissue culture media with sodium hypochlorite and that of autoclaving, in *Sequoia sempervirens* culture, in order to develop a less costly technique in the sterilization of glassware and nutrient media for plant tissue culture. In the trial with *Sequoia sempervirens*, the concentrations of sodium hypochlorite added to the culture media were (w/v): 0% (autoclaved); B) 0.002%; C) 0.003%; D) 0.004% and E) 0% (without autoclaving). It was observed that the concentrations equal to or higher than 0.003% of total chlorine added to the nutrient media resulted in complete sterilization, as well as in plants with larger numbers and shoots lengths.

Keywords: autoclaving; chemical sterilization; contamination.

INTRODUÇÃO

A técnica de propagação comercial de plantas em laboratório teve início na década de 70 (GONZÁLEZ, 1998). Àquela época, a quantidade de plantas produzidas comercialmente em laboratório

totalizava cerca de 500 milhões ao ano, em todo o mundo (PÉREZ, 1998).

O aumento contínuo do número de plantas produzidas em laboratório deve-se às diversas vantagens que essa técnica oferece, tais como possibilidade de multiplicação em larga escala e em

1. Bióloga, Dr^a., Pesquisadora de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semiárido, BR 428, Km 152, Caixa Postal 23, Zona Rural, CEP 56300-970, Petrolina (PE). juliana.ribeiro@cpatsa.embrapa.br
2. Engenheiro Agrônomo, PhD., Professor aposentado, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, (RJ). teixeira70@yahoo.com.br
3. Engenheira Agrônoma, Dr^a., Pesquisadora da Embrapa Semiárido, BR 428, Km 152, Caixa Postal 23, Zona Rural, CEP 56300-970, Petrolina (PE). debora@cpatsa.embrapa.br

Recebido para publicação em 28/08/2009 e aceito em 25/06/2010.

curto espaço de tempo de plantas que se propagam apenas lentamente pelas técnicas convencionais; utilização de espaço reduzido para a obtenção de grande quantidade de plantas, plantas completamente livres de doenças e pragas, independência quase completa das condições ambientais externas, elevada precisão no estabelecimento de cronogramas de produção e comercialização, elevada qualidade do produto no que diz respeito à homogeneidade e vigor das plantas obtidas, além de outras.

Dentre as opções existentes para tornar as biofábricas instalações mais econômicas, uma das mais importantes seria a substituição da autoclavagem por outra técnica menos onerosa (PONCE et al., 2000).

A autoclavagem é a técnica mais comumente utilizada para a esterilização de vidrarias, meios de cultura e materiais cirúrgicos em laboratório. É uma operação dispendiosa, pelo elevado custo do equipamento e do igualmente elevado consumo de energia. Por tais motivos, a substituição dessa técnica de esterilização por outra de menor custo seria altamente desejável.

O uso do forno de micro-ondas mostrou-se eficiente para a esterilização de materiais sólidos, desde que tomadas as precauções necessárias (SHERBONDY et al., 2002). Todavia, para líquidos, como no caso de meios de cultura, sua eficiência é reduzida, conforme relatado por Teixeira et al. (2004). Isso porque o líquido entra em ebulição e pode transbordar antes de decorrido o tempo necessário para a sua esterilização, dependendo do volume que se pretende esterilizar e do tamanho do frasco.

Quanto ao desenvolvimento de protocolos de esterilização de meios de cultura por processos químicos, pouca informação é encontrada na literatura científica. Alguns produtos químicos patenteados com esse objetivo (Plant Cell Technology Inc., 1995; Bioactivos Químicos CBQ Centro, 1997) não vêm tendo ampla utilização. Yanagawa et al. (1995) afirmam ter obtido sucesso na inoculação de sementes de orquídea em meio de cultura, em condições não assépticas, esterilizando-o com hipoclorito de sódio ou água oxigenada, ambos a 0,01%, e pulverizando o interior do frasco de cultura com solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, após a inoculação das sementes. Entretanto, apesar dessa informação ser de base científica, os resultados não têm sido utilizados na prática, pois tanto o agente esterilizante quanto a concentração deste adicionada ao meio nutritivo podem causar

problemas de fitotoxicidade nas plantas.

Teixeira e colaboradores (TEIXEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al. 2006; TEIXEIRA et al., 2008) levantaram informações que lhes permitiram desenvolver um protocolo de preparo de meio de cultura utilizando o hipoclorito de sódio com eficiência total para diferentes espécies de plantas, tanto para meios semissólidos quanto para meios líquidos. O objetivo desta pesquisa foi comparar a eficiência desse protocolo com o protocolo convencional que utiliza a autoclavagem como método de esterilização, bem como observar o comportamento de sequeio em meio de cultura esterilizado por essa técnica.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado para extração dos explantes foi proveniente de culturas-estoque de *Sequoia sempervirens* L., do Setor de Cultura de Tecidos Vegetais, do Laboratório de Fitotecnia do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, da Universidade Estadual do Norte Fluminense. As culturas-estoque foram mantidas por passagens de 30 dias (um subcultivo por mês), sob fotoperíodo de 16 horas, iluminância de $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo meio de cultura composto pelos sais de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), vitaminas de White (WHITE, 1943), 100 mg L^{-1} de i-inositol e 30 g L^{-1} de sacarose, sem reguladores de crescimento e esterilizado por autoclavagem (121°C , por 15 minutos).

Os meios de cultura correspondentes aos tratamentos autoclavados (tratamentos-controle A e B) foram preparados conforme o protocolo descrito por Murashige e Skoog (1962). Para os meios de cultura esterilizados quimicamente, utilizou-se o protocolo de preparo de meio de cultura descrito por Teixeira et al. (2006), com algumas modificações: a vidraria utilizada no preparo e acondicionamento do meio de cultura, após o uso anterior foi lavada com detergente e enxaguada com água clorada contendo 0,001% (p/v) de hipoclorito de sódio, preparada partindo de solução de hipoclorito de sódio a 6,75% (p/v) e estocada em estante fechada. No momento de preparo do meio, a referida vidraria foi novamente enxaguada com água deionizada adicionada de 0,003% (p/v) de hipoclorito de sódio, excetuando-se os tratamentos controle A e B cuja vidraria foi enxaguada apenas com água deionizada. Os tubos de ensaio nos quais seriam adicionados os meios de

cultura para inoculação das plantas, também foram enxaguados com água deionizada adicionada de 0,003% (p/v) de hipoclorito de sódio, no momento da adição do meio de cultura.

Após a o enxague das vidrarias a serem usadas no preparo do meio de cultura, procedeu-se ao preparo da água utilizada para completar o volume final do meio de cultura, constituindo-se de água deionizada adicionada de 0,0005% de hipoclorito de sódio (p/v). O preparo desta foi feito em recipiente previamente enxaguado em água clorada com 0,003% de hipoclorito de sódio (p/v).

Em seis Erlenmeyers, cada um correspondente a um tratamento, foram adicionados todos os reagentes, inclusive sacarose e agar, para o preparo dos meios de cultura conforme o protocolo descrito por Murashige e Skoog (1962). Os tratamentos consistiram das seguintes concentrações de hipoclorito de sódio (p/v): A) meio de cultura sem adição de NaClO e autoclavado (controle A); B) meio de cultura adicionado de 0,002% de NaClO; C) meio de cultura adicionado de 0,003 % de NaClO; D) meio de cultura adicionado de 0,004% de NaClO; E) meio de cultura adicionado de 0,005% de NaClO; e f) meio sem adição de NaClO e sem autoclavar (controle B).

Após 15 minutos da adição do NaClO aos diferentes tratamentos, o pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$, o volume final de cada tratamento foi completado com a água clorada a 0,0005% de NaClO, e os Erlenmeyers com os meios de cultura foram introduzidos no forno de micro-ondas para fusão do PHYTAGEL. Em seguida, conforme já descrito, realizou-se o enxague dos tubos de ensaio nos quais foram em seguida adicionados os meios de cultura de cada tratamento.

Todas as operações iniciais de preparo do meio de cultura foram efetuadas no ambiente não estéril da bancada do laboratório e somente o enchimento dos frascos de cultura foi efetuado na capela de fluxo laminar após decorridos pelo menos 15 minutos do enxague destes.

Os explantes de sequoia foram retirados dos tubos de ensaio nos quais estavam sendo cultivados e transferidos para placas de Petri. Com auxílio de pinças e bisturis, os explantes foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1,0 cm de comprimento, e esses fragmentos foram

então transferidos para tubos de ensaio contendo 20 mL dos meios de cultura correspondentes aos tratamentos citados acima. Todo esse procedimento foi realizado no ambiente estéril da capela de fluxo laminar, com utilização de ferramentas cirúrgicas e utensílios esterilizados por autoclavagem.

Um mês após a inoculação dos explantes nos meios com os tratamentos, foram coletados dados quanto ao número de culturas contaminadas e número e comprimento de ramos por cultura. Para tal procedimento, as plantas foram retiradas dos tubos de ensaio, o número de ramos foi contado e o comprimento de cada um foi medido com uma régua graduada em milímetros.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 6 tratamentos, sendo a unidade experimental constituída de um explante por tubo de ensaio e vinte repetições. Foi realizada a análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, são apresentados os padrões de desenvolvimento das plantas de *S. sempervirens* com base nos tratamentos utilizados.

Não foram observadas diferenças morfológicas macroscópicas significativas entre as plantas de todos os tratamentos, havendo diferenças apenas quanto ao número e ao comprimento dos ramos.

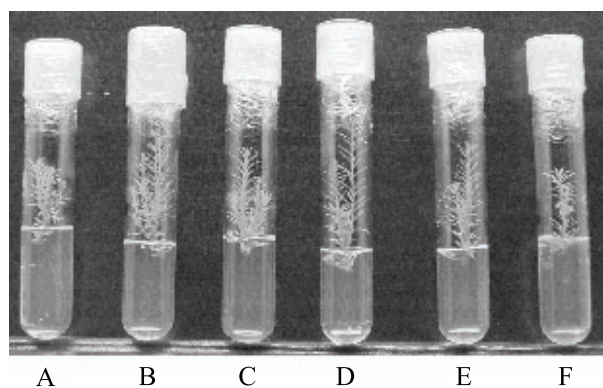


FIGURA 1: Padrões representativos de desenvolvimento vegetativo de plantas de *Sequoia sempervirens* em seus respectivos tratamentos.

FIGURE 1: Representative patterns of vegetative development of *Sequoia sempervirens* plants in each treatment.

Na Tabela 1, são apresentados os dados referentes ao número e a porcentagem de culturas contaminadas e ao tamanho e número médio de ramos. Os dados referentes ao tamanho e número médio de ramos do tratamento-controle B, que não foi submetido a esterilização por nenhum dos dois métodos (autoclavagem ou esterilização química) não foram adicionados à Tabela 1 por terem todas as culturas sido contaminadas.

De acordo com os dados da Tabela 1, o tratamento-controle A (autoclavado) e os tratamentos cujos meios de cultura foram adicionados de 0,002, 0,003, 0,004 e 0,005% de NaClO apresentaram número de culturas contaminadas estatisticamente iguais entre si e menores do que o valor apresentado pelo tratamento-controle B (não submetido a qualquer método de esterilização). Com base na concentração de 0,003% de hipoclorito de sódio no meio de cultura, não ocorreu qualquer contaminação, indicando serem essas concentrações seguras para o procedimento de esterilização dos explantes.

O valor médio de número de ramos por cultura foi mais elevado para as concentrações de 0,002 e 0,003% de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Todos os tratamentos esterilizados quimicamente proporcionaram valores superiores àquele observado no tratamento-controle autoclavado (tratamento-controle A).

Os tratamentos contendo 0,002, 0,003, 0,004 e 0,005% de NaClO no meio de cultura apresentaram comprimentos médios de ramos

estatisticamente inferiores ao valor observado no tratamento-controle autoclavado.

Com base no efeito positivo da esterilização partindo da concentração de 0,003% de hipoclorito de sódio no meio de cultura, promovendo um controle total da contaminação, pode-se afirmar que as concentrações de 0,003 e 0,004% seriam as mais recomendadas para esterilização química de meio nutritivo para crescimento *in vitro* de *S. sempervirens*. Isso porque, apesar de os brotos formados nos tratamentos esterilizados quimicamente se apresentarem com menores comprimentos médios quando comparados com aqueles cultivados no meio autoclavado (controle), estes se apresentaram em maior número médio, equilibrando a relação entre tais parâmetros para a realização da etapa de multiplicação.

As concentrações ótimas de hipoclorito de sódio observadas neste trabalho diferem em muito daquelas relatadas por Yanagawa et al. (1995), as quais só foram bem sucedidas, quanto à obtenção de assepsia, quando esterilizaram o meio com 0,01% de NaClO e o pulverizaram com 0,5% do mesmo esterilizante. Neste trabalho, ficou evidenciado que as quantidades usadas pelos autores citados são altamente prejudiciais às culturas e que há viabilidade de se esterilizar meios de cultura com quantidades inferiores de cloro, desde que se aplique a metodologia de Teixeira et al. (2006), utilizada nesta pesquisa. Antes de desenvolverem essa metodologia, Teixeira et al. (2005) também

TABELA 1: Número e porcentagem de culturas de sequoia contaminadas e número e comprimento médio de ramos por cultura em função da porcentagem (p/v) de hipoclorito de sódio adicionado ao meio nutritivo.

TABLE 1: Number and percentage (%) of contaminated cultures, number and mean length (cm) of branches of *Sequoia sempervirens*, as influenced by the concentration of NaClO (%) added to the culture medium.

NaClO adicionado ao meio de cultura (%)	Culturas contaminadas		Número médio de ramos por cultura	Comprimento médio dos ramos por cultura*
	Número	Porcentagem		
0 (autoclavado)	1 b	5	3,6 d	3,3 a
0,002	1 b	5	5,5 a	2,5 d
0,003	0 b	0	5,3 ab	2,6 cd
0,004	0 b	0	5,1 b	2,6 c
0,005	0 b	0	4,0 c	2,8 b
Sem esterilização	20 a	100	-	-

Os dados acompanhados de uma mesma letra, são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade

só conseguiram esterilização completa do meio de cultura com concentrações muito elevadas de cloro, quando se utilizou o protocolo convencional de preparo de meios de cultura, conforme Murashige e Skoog (1962). Todavia, a reação das culturas foi prejudicada.

Levando-se em consideração o estímulo causado pela presença de cloro nos meios de cultura esterilizados quimicamente em relação ao número médio de ramos de sequoia, e sabendo-se que o cloro em presença de compostos orgânicos forma com estes compostos clorados que ficam retidos no meio (MEYER, 1994; MACEDO et al., 2004), é provável que alguns desses compostos estejam envolvidos nessa influência benéfica, já que o cloro exerce função de catalizador da quebra da molécula de água no processo da fotossíntese (TAIZ e ZEIGER, 2004) e que essa função fisiológica em geral é praticamente nula em culturas *in vitro*. A essencialidade do cloro às plantas é bem conhecida, quando mantida em quantidades compatíveis com a exigência da espécie (EMMANUEL et al., 2004).

A ocorrência de um menor comprimento médio de ramos por cultura de sequoia nos meios esterilizados quimicamente, quando comparados aos meios autoclavados, se explicaria pela relação antagônica existente entre estes dois parâmetros, ou seja, sempre que o número de ramos aumenta o comprimento deles diminui, e vice-versa, já que a biomassa total produzida estará em função da quantidade de nutrientes disponível no ambiente limitado do frasco de cultura.

Considerando-se que o comprimento total por cultura pode ser obtido multiplicando-se o número médio de ramos pelo comprimento médio deles por cultura, ter-se-iam 13,75 cm para o meio esterilizado quimicamente que apresentou melhor resultado, e 11,9 cm para o tratamento no qual o meio nutritivo foi autoclavado, valores esses favoráveis ao meio esterilizado quimicamente.

CONCLUSÃO

As concentrações entre 0,003 e 0,004% de hipoclorito de sódio adicionadas ao meio de cultura de *Sequoia sempervirens* permitem completo controle da contaminação, maior comprimento total por cultura e formação de ramos em maior número, embora com menor comprimento do que em meio autoclavado.

AGRADECIMENTOS

À FENORTE/TECNORTE, FAPERJ e UENF, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIOACTIVOS QUÍMICOS CBQ CENTRO. Diaz Martinez Grisell; Conzalez Bedia Martha Mayra; Salazar Yera Eloisa; Castanedo Cancio Nilo Ramon; Cueto Sanchez Madaisy de la Ca; Gonzalez Lorenzo Carlos Manuel; Machado Rodriguez Rosa Margari; Martin Triana Esther Lilia; Ramirez Dieguez Alain. Microcide composition. AO1N43/00. CUEP 09208 04. 23 jun. 1997. Disponível em < <http://v3.espacenet.com/texto?AB>>. Acesso em: 23 abr. 2005.
- EMMANUEL, E. et al. Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Environment International**, Oxford, v. 30, p. 891-900, 2004.
- GONZÁLES, E. A. J. Generalidades del cultivo in vitro. In: PONCE, J. N. P. (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Villa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1998. p. 13-24.
- MACEDO, J. A. B. de. Uso de derivados clorados orgânicos no processo de desinfecção de água para abastecimento público. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 44., 2004, Fortaleza. **Anais...** Sociedade Brasileira de Química, 2004. Disponível em: <http://www.jorgemacedo.pro.br/CBQ%202004%20O%20USO%20DE%20DERIVADOS%20CLORADOS%20ORGANICOS.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2009.
- MEYER, S. T. O uso do cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 99-110, 1994.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PÉREZ, P. A. O. Introduccion a la propagación masiva. GONZÁLES, E. A. J. Generalidades del cultivo in vitro. In: PONCE, J. N. P. (Ed.). **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Villa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1998. p. 125-133.
- GURI, A. Z.; PATEL, K. N. **Compositions and methods to prevent microbial contamination**

- of plant tissue culture media. C12N005/00; C12N005/02. 2 jun. 1995, 5,750,402 12 maio 1998. Disponível em: <http://www.kitchenculturekit.com/ppmPatent5,750,402.pdf>> Acesso em: 23 abr. 2005.
- PONCE, J. N. P.; CASTELLÁ, M. S.; PÉREZ, P. O. Possibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. **Biotecnología Vegetal**, Cuba, v. 1, p. 3-12, 2000.
- SHERBONDY, A. L. et al. Variability in catheter microwave sterilization techniques in a single clinic population. **Journal of Urology**, Linthicum, v. 168, p. 562-564, 2002.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. 2004. 719 p.
- TEIXEIRA, S. L.; SOUSA, R. T. S.; TEIXEIRA, M. T. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 52, n. 302, p. 499-507, 2004.
- TEIXEIRA, S., L. et al. Sterilization of nutrient medium for plant tissue culture, by combining chemical sterilants with microwave oven. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 52, n. 301, p. 343-349, 2005.
- TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus*/ cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Holanda, v. 86, n. 3, p. 375-378, 2006.
- TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação in vitro de Eucalyptus pellita. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 8, p. 185-191, 2008.
- YANAGAWA, T. et al. Application of disinfectants to orchid seeds, plantelets and media as a means to prevent /in vitro/ contamination. **Lindleyana**, Palm Beach, v. 10, n. 1, p. 33-36, 1995.
- WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, Lakeland, v. 7, p. 53-65, 1943.